

MYCOFLORE DES CERNEAUX DE NOIX DESTINÉS A L'ALIMENTATION

par F. SEIGLE-MURANDI*, J. NICOT**, L. SORIN* et J. LACHARME*

RÉSUMÉ. — Le recensement méthodique de la mycoflore de la noix au cours de 4 années successives met en évidence une flore particulièrement diversifiée où prédominent les *Penicillium*. Le mode de ramassage et les traitements ultérieurs ont une très grande importance sur le degré de pollution et, en conséquence, il convient d'optimiser les techniques de ces opérations lors de l'utilisation des cerneaux dans l'alimentation, en particulier dans l'industrie fromagère.

SUMMARY. — The evolution of walnut mycoflora was followed during 4 years : various microfungi were found, the most common belonging to genus *Penicillium*. Contamination depends on way of harvesting and further handling; these treatments have to get better when green walnuts are utilised in alimentation, particularly in the cheese industry.

INTRODUCTION

Dans un but de revalorisation de l'appellation «Noix de Grenoble», nous nous sommes intéressés au problème de la noix et de ses sous-produits, huile et tourteaux. En 1976 et dans le cadre d'un travail suscité par les membres du Conseil Général de l'Isère et de l'Établissement Public Régional, nous avons entrepris une recherche exploratoire sur les éléments de pollution de la noix en rapport avec d'autres travaux portant sur les qualités diététiques de ce fruit, la préparation et les conditions d'une bonne conservation de l'huile ainsi que la

* Laboratoire de Biologie Végétale et Cryptogamie, UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Grenoble, 38240 Meylan.

** Laboratoire de Cryptogamie du M.N.H.N., 12 rue Buffon, 75005 Paris. — L.A. 257 (CNRS).

valorisation éventuelle des tourteaux. Les noix, récoltées au cours de 4 années successives, ont fait l'objet d'une étude progressive de la mycoflore susceptible de les altérer, en fonction de différents paramètres liés à la technologie propre aux utilisateurs. Les protocoles techniques de l'expérimentation, concernant le mode de récolte et les traitements subis par les noix, ont été définis chaque année par l'INVUFLEC (actuellement CTIFL) et les établissements BEL.

Compte-tenu de l'importance des cerneaux dans l'industrie agroalimentaire et surtout actuellement dans l'industrie fromagère, ce sont presque essentiellement ceux-ci qui ont fait l'objet de cette étude; la recherche des contaminants au niveau des brous a été également réalisée sur certains lots afin de déterminer leur mode de cheminement. Par ailleurs, une étude systématique de la flore du sol a également été faite en 1978 et 1979. Ces données nous ont permis de définir d'une façon assez complète la flore de contamination et la fréquence relative de certaines espèces.

Si de très nombreux travaux se rapportent à l'étude de la microflore fongique de diverses graines, quelques-uns à des fruits à péricarpe ligneux, très peu concernent celle de la noix. PELHATE (1968) fait un recensement méthodique de la mycoflore des blés de conservation. CAHANIER et POISSON (1973), PELHATE (1979) étudient la microflore du maïs en fonction du mode de stockage et avant récolte; l'évolution de la microflore de la féverole est suivie par CARANTINO et coll. (1976), celle du pois par CHARPENTIÉ et coll. (1976) et CHARPENTIÉ et NICOT (1978). Parmi les nombreuses recherches effectuées sur les arachides, on peut citer celles de MOREAU (1976) et de WALIYAR et ROQUEBERT (1979). Enfin, plus récemment, CHARPENTIÉ et MARAKIS (1980) ont recensé la mycoflore des caroubes. En ce qui concerne la noix, très peu d'auteurs se sont intéressés à cette cause d'altération que constituent les microorganismes qui peuvent entraîner une transformation du substrat et la synthèse éventuelle de substances toxiques. WEHNER et RABIE (1970) analysent cependant les populations fongiques et bactériennes de la noix et d'autres fruits secs et concluent que la noix est la plus riche en microorganismes avec une prépondérance - il s'agit d'une étude réalisée en Afrique du Sud - du genre *Aspergillus*. Antérieurement KODAL (1965) avait signalé la présence d'*Escherichia coli* dans les aliments à base de noix et FRAZIER (1967) suivi les contaminations microbiennes intervenant lors du développement et du traitement de la noix et de fruits secs.

En réalité, il s'agit là d'une détermination de la mycoflore potentielle car la noix est un substrat peu favorable au développement des moisissures (humidité faible, téguments qui s'opposent à la prolifération microbienne, coques soudées) et il convient dès lors de la considérer comme un vecteur des contaminants susceptibles d'être révélés lors de manipulations ultérieures comme c'est le cas dans l'industrie fromagère. Ce problème revêt peu d'importance dans la mesure où les cerneaux sont placés en présence de substrats peu hydratés (pâtisseries, chocolats). Par contre, les fromages présentent un excellent milieu de développement pour les spores ou filaments mycéliens apportés par les cerneaux. Il s'agit là du problème le plus délicat qui limite la conservation du produit fini et

interdit pratiquement toute exportation lointaine. C'est pour tenter de résoudre cette difficulté que nous avons entrepris l'analyse de la flore des cerneaux de noix.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A. — ÉCHANTILLONNAGE

Des lots de noix récoltées au cours de quatre années consécutives (1976 à 1979) ont fait l'objet d'une étude systématique des agents de contamination fongique des cerneaux; elle a été complétée par la détermination de la mycoflore du mésocarpe ou brou (1979) et du sol de la noyeraie (1978 et 1979).

En 1976, l'analyse est faite sur les cerneaux de noix reçues en coque, en provenance de Vourey (Isère) telles qu'elles sont livrées à la consommation c'est-à-dire récoltées à la main, lavées à l'eau faiblement javellisée et séchées en grenier.

En 1977, l'étude a porté sur 14 lots de noix en coque, variété Franquette, en provenance des vergers expérimentaux de la région de Saint-Marcellin (Isère); le protocole utilisé permet de mettre en évidence l'influence du traitement phytosanitaire des noyers par la bouillie bordelaise, l'influence du temps de récolte - les noix étant cueillies sur l'arbre ou récoltées au sol dans un laps de temps variable et déterminé -, l'influence de la technique de nettoyage (lavage à l'eau claire, à l'eau javellisée ou pas de lavage), enfin l'influence d'un traitement soufré par SO_2 après la récolte.

En 1978, l'échantillonnage est représenté par 16 lots de noix récoltées dans les 48 h ou 6 à 8 jours, lavées à l'eau javellisée ou non lavées, séchées de manière naturelle ou artificielle. Elles sont conditionnées en coque ou en cerneaux sous vide, sous azote ou sous air ambiant à différentes températures (- 18°C, + 2°C, + 10°C et température ambiante). Les analyses sont effectuées en avril, juin, septembre 1979 pour les noix en coque et en avril, septembre 1979 pour les cerneaux.

En 1979, l'échantillonnage se limite à un lot de noix cueillies sur l'arbre et à un seul lot de récolte : les noix sont prélevées immédiatement après leur chute sur une bâche, lavées à l'eau claire et séchées artificiellement : un échantillonnage du stock nous a été adressé périodiquement une fois par mois.

Enfin, en 1978 et 1979, une étude complémentaire de la mycoflore du sol est réalisée ainsi que l'examen de noix mûres à brous non fissurés et de brous fissurés sur bâche et au sol en 1979.

B. — TECHNIQUES UTILISÉES

1. - L'isolement des moisissures potentielles des cerneaux apparemment

sains est précédé d'une observation directe du matériel après incubation en chambre humide; la détection visuelle des espèces hygrophiles est faite sur les cerneaux placés individuellement dans de petits cristallisoirs eux-mêmes répartis dans un récipient clos; une couche d'eau d'environ 1 cm maintient un taux d'humidité élevé et constant.

2. - L'isolement méthodique de la flore des cerneaux utilise les techniques classiques qui sont habituellement employées pour la détermination de la flore des graines (PELHATE, 1968). Toutefois les noix en coque subissent un traitement préalable: elles sont flambées à l'alcool et ouvertes stérilement. Les cerneaux sont directement ensemencés sur différents milieux gélosés à 2%: malt 2%, Czapek. Les espèces xérophiles sont révélées par des milieux hyperosmotiques (malt 5% + saccharose 3% + NaCl 8%; Czapek à 200 g de saccharose). L'addition de chloramphénicol (0,5 g/litre) limite d'éventuels développements bactériens.

3. - Une évaluation quantitative de la contamination fongique superficielle utilise une méthode par dilution inspirée de celle appliquée à la féverole par CARANTINO et coll. (1976) et au pois par CHARPENTIER et coll. (1976): 50 g de cerneaux sont agités dans 100 ml de diluant stérile (NaCl: 9 g, bactopeptone Difco: 1 g, tween 80: 0,033 g, eau distillée sur verre q.s.p.: 13 litres) pendant 30 minutes. Le surnageant est dilué au 1/10, 1/50, 1/100, 1/200 et 1/500: 1 ml de chaque dilution est étalé sur milieu malt-chloramphénicol. Le comptage des colonies est effectué après 10 jours d'incubation à température ambiante et les résultats sont ramenés à 100 g de cerneaux.

4. - Enfin, la flore des brous et du sol est isolée sur milieux au malt, malt-chloramphénicol, malt-bénomyl (5 ppm) et Czapek selon deux procédés: étalement direct et ensemencement au fond des boîtes de Pétri selon une méthode des «Soil plates» de WARCUP (PARKINSON et WAID, 1960).

RÉSULTATS

Ils sont donnés pour chacune des récoltes annuelles et en fonction des différents paramètres pris en compte (modes de récolte, lavage, séchage, conservation, etc..)

A. — RÉCOLTE 1976

Les analyses de l'année 1976 ont porté sur un échantillonnage limité qui a permis de mettre au point les techniques appliquées ultérieurement. Les résultats sont partiels et non quantitatifs. Parmi les espèces isolées à partir de lots de 100 noix, 18 sont apparues comme les plus constantes et semblent représentatives.

Mucorales

- Cunninghamella elegans* Lendner
Rhizopus stolonifer (Ehrenb. ex Fr.) Lind.

Fungi imperfecti

- Alternaria alternata* (Fr.) Keissler
Botrytis cinerea Pers. ex Fr.
Epicoccum purpurascens Ehrenb. ex Schlecht.
Fusarium oxysporum Schlecht.
Paecilomyces variotii Bain.

Aspergillus

- Aspergillus flavus* Link. ex Fr.
Aspergillus fumigatus Fres.
Aspergillus niger van Tieghem
Aspergillus repens (Corda) Sacc.
Aspergillus versicolor (Vuill.) Tiraboschi

Penicillium

- Penicillium brevicompactum* Dierckx
Penicillium cyclopium Westling
Penicillium expansum Link ex S. F. Gray
Penicillium frequentans Westling
Penicillium spp. (2 espèces)

B. — RÉCOLTE 1977

(Tableau I et Annexe I)

L'analyse a été conduite méthodiquement de manière à définir le mieux possible les conditions de récolte, lavage, séchage et stockage limitant au maximum les contaminations des cerneaux qui ont subi des traitements différents. Elle porte sur 60 graines par lot (14 lots). Le tableau I donne des indications sur les contaminations de chaque lot, leur fréquence d'apparition en pourcentage par rapport aux 464 souches isolées à partir des 14 échantillons. Ces valeurs permettent de définir les espèces les mieux représentées, caractéristiques de la noix (pour la récolte 1977), comme *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium purpurogenum* et à un degré moindre : *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus repens*, *Penicillium frequentans*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium italicum*, *Cladosporium cladosporioides*.

La comparaison des différentes flores conduit à classer, d'après PELHATE (1968) les espèces en 3 groupes : fidèles (présentes dans 80 à 100% des lots : *P. expansum*), fréquentes (dans 50 à 80% des lots) et les espèces occasionnelles et rares. On constate que les espèces les mieux représentées apparaissent dans la majorité des lots quelque soit le traitement subi, que 60,7% sont des *Penicillium* et 9,5% des *Aspergillus*.

SOUCHES	LOTS														f1	f2	
	502	131	132	133	1112	1121	1122	1211	1221	1231	1241	1411	1421	1422			
PENICILLIUM																	60,7
<i>P. brevicompactum</i> Bierckx	2	7	1	1	6	6	5			3	11			6	46	9,9	
<i>P. echinulatum</i> Fassatiens		2			2				2		2			1	9	1,9	
<i>P. expansum</i> Link ex S.F. Gray	7	7	11	5	5	5	5	7	6	7	4	5	7	4	80	17,3	
<i>P. frequentans</i> Westling		3			3			1		6	6	1		11	20	4,3	
<i>P. implicatum</i> Biourge		1				1				1					3	0,7	
<i>P. italicum</i> Wehmer		3	3		3	2	1	1				11	2	2	19	4,1	
<i>P. purpurogenum</i> Stoll	5	2	7	5	2		2	3		5	3	3	3	3	40	8,6	
<i>P. roqueforti</i> Thom		11			7	3	5			1	3			1	24	5,2	
<i>P. rugulosum</i> Thom	1									2				2	5	1,1	
<i>P. spinulosum</i> Thom	1	1													2	0,4	
<i>P. thomii</i> Maire	1														2	0,4	
<i>P. variabile</i> Sopp		1		1										3	30	6,5	
<i>P. verrucosum</i> var. <i>dycloptum</i> (Westling) Samson & al.		3	3				7	3	2	2	1	6		1	1	0,2	
<i>P. oermiculatum</i> Dangeard																9,5	
ASPERGILLUS																1	0,2
<i>A. candidus</i> Link ex Fr.										2	1				11	0,7	
<i>A. echinulatus</i> (Delacr.) Thom & Church															1	0,2	
<i>A. flavus</i> Link ex Fr.	1						1							1	2	0,4	
<i>A. niger</i> van Tieghem															1	0,2	
<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	1										1				1	0,2	
<i>A. parasiticus</i> Speare										8	8	1	1	4	26	5,6	
<i>A. repens</i> (Corda) Sacc.	1	2		1						1	2			1	6	1,3	
<i>A. nuber</i> (Koenig & al.) Thom & Church		2													1	3	0,7
<i>A. varicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi											2					22	
FUNGI IMPERFECTI																	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	1			2			1		1		2	1	2	1	11	2,4	
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud							1			1		1			3	0,7	
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fr.	2	3		3	3		3	2	9	3	3	4	4	6	45	9,7	
<i>Chaetomella</i> sp.				1											1	0,2	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fr.) de Vries	4	1	2	5				3			11				17	3,7	
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb. ex Schlecht.	2	1						2		3	1	2			11	2,4	
<i>Fusarium arthrosporioides</i> Sherbakoff	1						1								1	0,2	
<i>Fusarium lateritium</i> Nees ex Fr.							1										
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon									1	1					1	0,7	
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht									1	1					2	0,4	
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.							1						1				
<i>Ophiostoma piceae</i> (Münch) H. & P. Sydow								1				1			1	0,2	
<i>Phoma</i> sp.															1	0,2	
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai											1				1	0,2	
<i>Verticillium tenerum</i> (Nees ex Pers.) Link																7,5	
MUCORALES																1	0,2
<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner												1				1	0,2
<i>Mucor heterosporus</i> Fischer sensu Baijal & Mehrotra					1												
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer			3	1		7	2		1	2			2	11	20	4,3	
<i>Mucor varians</i> Povah				1											1	0,2	
<i>Phycomyces nitens</i> Kunze	2					1	4	1		1					9	1,9	
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb. ex Fr.) Lind					2					1					3	0,7	
Total des souches	32	43	25	26	34	34	34	20	27	39	64	11	24	42			
Nombre d'espèces	14	16	7	11	10	10	13	8	10	16	21	9	9	18			

TABLEAU I : ANNEXE I
RÉCOLTE 1977 : CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS LOTS*

Traitement phytosanitaire

Récolte ■ sol dans les 48 h.

Séchage dans les 24 h.

1112 : noix récoltées sur noyers traités, séchées artificiellement

1121 : noix récoltées sur noyers non traités, séchées naturellement

1122 : noix récoltées sur noyers non traités, séchées artificiellement.

Mode de récolte

1211 : noix cueillies sur l'arbre (brous fissurés), séchées naturellement

1221 : noix récoltées au sol dans les 48 h, séchées naturellement

1231 : noix récoltées au sol dans les 6-8 jours, séchées naturellement

1241 : noix récoltées ■ sol dans les 12-15 jours, séchées naturellement.

Mode de lavage

Récolte au sol dans les 48 h.

Séchage artificiel.

131 : noix lavées à l'eau claire

132 : noix lavées à l'eau javellisée

133 : noix non lavées.

Temps d'attente avant le séchage et mode de séchage

Récolte au sol dans les 48 h.

1411 : séchage naturel dans une limite de 24 h après la récolte

1421 : séchage naturel dans un temps compris entre 48 et 72 h après la récolte.

1422 : séchage artificiel dans un temps compris entre 48 et 72 h après la récolte.

Essai traitement soufré

lot SO₂.

* Protocole technique fourni par le producteur (INVUFLEC).

a) Influence du traitement phytosanitaire

Les différences observées entre les lots 1112 et 1122 traités ou non à la bouillie bordelaise, séchés tous deux artificiellement, sont peu sensibles: 10 espèces sont dénombrées dans le lot traité contre 13 dans le lot non traité, le nombre de souches isolées étant identique. Il est à noter que les noyers traités et non traités appartiennent à des vergers différents et éloignés les uns des autres ce qui peut, en soi, induire de faibles variations de la microflore. La comparaison des lots 1121 et 1122 fournit une indication sur l'influence du mode de séchage: il semble que le séchage artificiel augmente le nombre des espèces; quant au nombre de souches isolées, il reste inchangé. Le traitement phytosanitaire appliqué au noyer en cours de végétation influence peu la flore fongique des graines dominée ici par des *Penicillium*.

b) Influence du mode de récolte

L'étude des lots 1211, 1221, 1231 et 1241 fait apparaître une nette progression du nombre d'espèces et de souches isolées. La comparaison de la flore du lot 1211 (noix cueillies sur l'arbre) à celle des lots récoltés au sol conduit à la mise en évidence d'un apport provenant du sol. Un contact à terre de 48 h amène plusieurs espèces nouvelles et, au bout de 15 jours, le nombre des microorganismes différents a triplé. Il y a donc une augmentation très nette de la contamination (souches et espèces) en relation avec le temps de contact au sol.

c) Influence du mode de lavage des noix après la récolte

La pratique courante est de laver à l'eau claire les noix destinées à la consommation. Cependant, le dénombrement des espèces et des souches des lots 131, 132 et 133 semble prouver qu'une absence de lavage est préférable à un lavage à l'eau pure : l'agitation dans l'eau est susceptible de disperser les spores et d'aggraver la contamination sans que l'on puisse préciser par quel processus les microorganismes sont entraînés au coeur de la graine (coques dessoudées, pénétration par l'ombilic). Par contre, un rinçage à l'eau javellisée diminue sensiblement le nombre des contaminants. Ces observations demandent à être confirmées sur un échantillonnage plus important. Le lavage à l'eau faiblement javellisée, bien que souvent critiqué, serait à retenir dans la mesure où il a l'avantage supplémentaire d'offrir un fruit éclairci et plus présentable.

d) Influence du temps d'attente avant séchage et du mode de séchage

Les séchages naturels des lots 1411 et 1421 ont été entrepris respectivement 24 h et 72 h après la récolte : on dénombre autant d'espèces pour les deux lots mais un peu plus de souches pour le lot 1421. Les noix sont stockées 24 h à 72 h dans des conditions proches de celles du séchage naturel qui dure 3 semaines à un mois. Il est compréhensible que des variations du temps de séchage d'une durée limitée (de l'ordre de 5%) aient peu d'influence sur la mycoflore de la noix. Une étude similaire n'a pas pu être effectuée sur des lots séchés artificiellement : les résultats auraient été sans doute plus significatifs. Par contre, en comparant les lots 1421 (séchage naturel) et 1422 (séchage artificiel) on constate que, dans les conditions climatiques de l'année 1977, le séchage artificiel entraîne une nette augmentation de la pollution fongique, résultats déjà obtenus de façon moins évidente avec les lots 1121 et 1122 (paragraphe a).

e) Influence du traitement soufré

Destiné à blanchir les coques et à limiter le développement des microorganismes pendant le stockage, ce traitement ne semble pas avoir une efficacité particulière, les chiffres obtenus se situant dans la moyenne des résultats.

C. — RÉCOLTE 1978

Les résultats concernant les noix en coque sont regroupés dans le Tableau II, ceux en rapport avec la conservation des noix en coque et en cerneaux dans le Tableau III.

a) Influence de la technique d'isolement

Les différences relevées entre tous les lots sont peu sensibles; le nombre de souches isolées est supérieur à celui de l'année 1977, mais le nombre d'espèces est comparable. Pour les noix en coque, nous définissons à nouveau la fréquence de chaque espèce, les *Penicillium* étant majoritaires suivis de *Mucor*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Epicoccum*, etc... La méthode par dilution est ici peu significative, le nombre de cerneaux par lot étant peu élevé: seul un échantillonnage beaucoup plus important aurait permis d'exploiter cette technique.

Quant aux cerneaux, on ne peut que mentionner la présence de certaines espèces; nous privilégions cette fois la méthode par dilution qui fournit une valeur moyenne reflétant la contamination de chaque lot de cerneaux. En fait, étant donné les taux de dilution atteints (1/200 à 1/500), les seuls genres dénombrés sont les *Penicillium*, connaissant leur fréquence et l'intense sporulation de leurs appareils de fructification.

b) Influence du mode de collecte et de séchage (Tableau II)

En ce qui concerne la récolte, les conditions climatiques exceptionnellement favorables de l'automne 1978 ont entraîné de faibles variations de la contamination fongique en fonction du mode de collecte. Toutefois on préfère la récolte

LOTS	211		213		311		314		411		511		E1	E2	X
	T ₀	T ₃	T ₀	T ₃	T ₀	T ₃	T ₀	T ₃	T ₀	T ₃	T ₀	T ₃			
<i>Alternaria</i> sp.		1	18	3	2	3	7	5	3	4	1	3	31	5,7	
<i>Aspergillus</i> sp.							1	2	4	4	2	4	7	1,3	
<i>Aureobasidium</i> sp.			4	2	6	5	6	5	3	4	3	3	22	4	
<i>Botrytis</i> sp.	10	■	6	7	6	4	7	6	12	3	4	5	45	8,3	
<i>Cladosporium</i> sp.		2		10					9	7	1	2	10	1,8	
<i>Cunninghamella</i> sp.									1				1	0,2	
<i>Epicoccum</i> sp.	2	4	16	8	2	5	3	2	5	6	1		29	5,3	
<i>Fusarium</i> sp.				2					1		1		2	0,4	
<i>Mucor</i> sp.				2		1			1	2	50	12	51	9,4	
<i>Penicillium</i> sp.	48	54	32	33	54	62	92	93	52	63	38	42	316	58,5	
<i>Rhizopus</i> sp.	10	7	6	8							5	1	21	3,8	
% de noix contaminées	72	75	62	58	65	73	85	86	66	71	91	73			
Total des souches	70	74	82	75	70	80	117	113	94	93	110	72			
Nombre de genres	4	■	6	9	5	■	6	6	11	8	13	■			

immédiate après le gaulage. L'utilité du lavage reste encore à démontrer : efficace sur la récolte 1977, il semble nocif sur celle de 1978. L'analyse des lots 311 et 314 démontre cette fois l'avantage du séchage artificiel, résultats contradictoires avec ceux de l'année précédente.

c) Influence du mode de conservation (Tableau III)

Matériel Biologique	Noix en coque			Cerneaux									Cerneaux sous azote			
				314 Boîte carton pression atm.			312 - 313 Boîte métal. sous vide			411 - 412 Boîte métal. sous vide						
Lots n°	211 - 212			-18° + 2° +10°			-18° + 2° +10°			-18° + 2° +10°						
Température	-18°	+ 2°	+10°	TA	-18°	+ 2°	+10°	-18°	+ 2°	+10°	-18°	+ 2°	+10°	-18°	+ 2°	+10°
<i>Aspergillus sp.</i>					*	*	*	*	*	*				*	*	*
<i>Alternaria sp.</i>	*	*	*	*		*	*	*	*	*		*	*	*	*	*
<i>Aureobasidium sp.</i>	*	*	*	*	*	*	*				*	*	*	*	*	*
<i>Botrytis sp.</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Cladosporium sp.</i>					*	*	*				*	*	*			
<i>Cunninghamella sp.</i>			*	*										*	*	*
<i>Epinecium sp.</i>	*	*	*	*				*	*	*	*	*	*			*
<i>Fusarium sp.</i>								*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Hunor sp.</i>			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Penicillium sp.</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Rhizopus sp.</i>					*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nombre de colonies x 10 ⁴ pour 100 g de cerneaux	50	220	50	680	1230	1390	144	360	670	980	430	130	350	100	50	100

En ce qui concerne le conditionnement, la comparaison des lots est difficile dans la mesure où plusieurs paramètres varient simultanément : température de stockage, atmosphère, emballage. Il est certain que la plus mauvaise conservation est réalisée à pression atmosphérique en boîtes de carton ; par contre, nous pouvons retenir comme plus avantageux, le conditionnement sous azote. La température de stockage joue également un rôle : pour les cerneaux, la population fongique augmente généralement avec la température. Quant aux noix en coque, les résultats sont proches de ceux obtenus avec les cerneaux conditionnés sous azote et restent constants dans le temps. La conservation à -18°C dans de mauvaises conditions (lot 314) favorise le développement de moisissures latentes.

D. — RÉCOLTE 1979

(Tableau IV)

L'échantillonnage se limite à des noix en coque récoltées sur bêche immédiatement après leur chute, lavées à l'eau claire et séchées artificiellement. Les

analyses sont répétées de mois en mois en vue de déceler une évolution possible de la flore au cours du stockage. Les résultats, présentés dans le tableau IV, portent sur 5 mois de conservation, la recherche des contaminants ayant été faite, comme précédemment, sur les cerneaux.

SOUCHES	DATE DES ANALYSES					
	1979	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler		1	-	3	3	2
<i>Anthraxium phaeospermum</i> (Corda) M.B. Ellis		-	-	-	-	2
<i>Aspergillus flavus</i> Link ex Fr.		-	1	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres.		-	-	-	1	-
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud		6	9	8	11	14
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fr.		1	1	5	1	4
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) Vries		9	7	8	13	6
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb. ex Schlecht.		1	1	2	1	-
<i>Fusarium solani</i> (Marr.) Sacc.		-	1	3	1	6
<i>Penicillium</i> spp.		31	37	70	72	82
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb. ex Fr.) Lind		-	1	1	-	-
Total de souches pour 100 noix		49	58	100	103	116
■ de noix contaminées		42	46	■	74	80
■ ■ Penicillium spp.		63	63	70	70	70
Nbre de colonies x 10 ⁴ /100 g cerneaux		6	6	10	10	13

Tableau IV. — Récolte 1979 - Noix en coque. Les noix sont récoltées sur bêche, lavées à l'eau claire et séchées artificiellement.

Les noix vertes prélevées sur l'arbre enveloppées de leur brou encore vert, épais, à peine fissuré, n'ont donné lieu à aucune observation après 14 jours d'incubation sur milieu de culture; c'est pourquoi les résultats entièrement nuls enregistrés sur ces lots n'apparaissent pas dans le tableau IV. Si l'on examine les résultats obtenus à partir des noix récoltées sur bêche et conservées pendant 5 mois, on constate que la flore intermédiaire et la flore de stockage sont faiblement représentées et qu'il y a peu de variations dans le temps. La méthode par dilution donne des résultats rigoureusement comparables à la technique classique d'ensemencement sur boîte; les valeurs enregistrées sont jusqu'à 100 fois inférieures à celles de l'année précédente, ce qui prouve, sans conteste, l'intérêt et la nécessité de soigner les conditions de récolte.

SOUCHES	ECHANTILLONS			
	Sol 1978	Sol 1979	Brou Sol	Brou Bâche
MUCORALES				
<i>Actinomyces elegans</i> (Eidam) Benjamin et Hesselcine	+	+		
<i>Coenomyces zofouliifera</i> Linder		+		
<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner	+			
<i>Dimargaris</i> sp.		+		
<i>Mortierella alpina</i> Perron.		+		
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	+	+		
<i>Mucor mucido</i> L. ex Fr.	+			
<i>Mucor plumbeus</i> Mon.	+	+		
<i>Mucor racemosus</i> Fres.	+			
<i>Rhizopus arrhizus</i> Fischer	+			
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb. ex Fr.) Lind		+		
<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex Schroet.		+		
<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuill.	+			
FUNGI IMPERFECTI				
<i>Acremonium cerealis</i> (Karst.) W. Gams		+		
<i>Acremonium roseum</i> W. Gams	+			
<i>Acremonium terricola</i> (Miller et al.) W. Gams		+		+
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keisler	+	+		+
<i>Aphanocladium album</i> (Preuss) W. Gams		+	+	
<i>Anthriscium sphaerospermum</i> Fuckel		+		
<i>Archrobotrya oligospora</i> Fres.	+			
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud	+	+	+	+
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fr.			+	+
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr.		+	+	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	+	+	+	+
<i>Cylindrocarpum</i> sp.		+	+	
<i>Dendrostilbella byssina</i> (Alb. et Schwein.) V. Höhnelt		+		
<i>Epicoecium purpurascens</i> Ehrenb. ex Schlecht.	+	+	+	
<i>Fusarium arthrosporioides</i> Sherbakoff	+			
<i>Fusarium lateritium</i> Nees ex Fr.		+	+	
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon		+		
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.		+	+	
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.		+	+	+
<i>Geotrichum candidum</i> Link	+			
<i>Gliocladium roseum</i> Bain.	+		+	+
<i>Paeclomyces farinosus</i> (Holm ex S.F. Gray) A.M. Brown et G. Smith		+		

SOUCHES	ECHANTILLON			
	Sol 1978	Sol 1979	Brou sol	Brou Bâche
FUNGI IMPERFECTI (suite)				
<i>Papulaspora</i> sp.	+			
<i>Pestalotia palmarius</i> Cooke		+		+
<i>Phoma</i> sp.			+	
<i>Scotlecobasidium</i> sp.		+		
<i>Stachybotrys atra</i> Corda	+			
<i>Thyranophora pentatillioides</i> (Roum.) Kendrick		+		
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bain.	+			
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem	+			
<i>Trichoderma polyosporum</i> (Link ex Pers.) Rifai	+	+		
<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link ex S.F. Gray		+		
<i>Verticillium fungicola</i> (Preuss) Hasserb.		+	+	
<i>Verticillium lecanii</i> (Zimm.) Viegas				+
<i>Volutella rosala</i> Cooke		+		
PENICILLIUM				
<i>P. expansum</i> Link ex S.F. Gray	+	+		
<i>P. italicum</i> Wehmer		+		
ASPERGILLUS				
<i>A. niger</i> van Tieghem		+		
<i>A. terreus</i> Thom		+		
<i>A. ustus</i> (Bain.) Thom & Church		+		
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	+	+		

Tableau V. — Flore du sol et des brous. Étude de la mycoflore du sol (1978 et 1979) et des brous tombés au sol ou sur bâche (1979).

E. — FLORE DU SOL ET FLORE DES BROUS

(Tableau V)

Les résultats figurant dans le tableau V se rapportent à l'étude de la mycoflore du sol de la noyeraie en 1978 et 1979 et à celle de brous (fissurés ou non) de noix mûres récoltées en 1979 soit sur bâche soit au sol. On peut remarquer qu'aucune Mucorale, ni *Aspergillus*, ni *Penicillium* ne semblent pouvoir s'installer et se développer sur des brous alors qu'ils sont présents au niveau des cerneaux. Il s'agit de contaminants secondaires. Sur les brous fissurés prélevés à même le sol, un grand nombre d'espèces sont susceptibles de s'installer et de contaminer ultérieurement les fruits si ceux-ci sont fissurés : 13 espèces sont isolées à partir du brou ramassé au sol, 9 seulement à partir du brou recueilli sur bâche. Il est évident que l'utilisation d'une bâche et une récolte rapide évitent la contamination des noix par le brou en décomposition en contact avec la flore du sol.

L'examen de la flore du sol révèle la présence de souches et d'espèces, en nombre plus important que sur les fruits, surtout en 1979; sans aucun doute, elles ont dû largement contribuer à la contamination des noix tombées au sol.

F. — FLORE DES PRODUITS FABRIQUÉS

Les cerneaux de noix qui nous ont été soumis sont destinés à l'industrie fromagère, où ils sont incorporés à la pâte de fromages cuits.

Afin de compléter notre recherche, nous avons effectué quelques prélèvements sur les lieux de fabrication des fromages. Ils nous ont permis de caractériser sur les cerneaux, au moment de l'emploi, des Mucorales (*Absidia glauca*, *Mucor racemosus* var. *sphaerosporus*), *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus repens* et des *Penicillium* (*P. expansum*, *P. frequentans*, *P. verrucosum*, *P. purpurogenum* et quatre autres espèces non identifiées), déjà mis en évidence à la récolte.

Des prises d'air réalisées dans la fromagerie en trois lieux différents (coupe du fromage, mise en place des cerneaux, emballage), ont permis d'isoler 18 colonies dont 13 *Penicillium* spp., 2 *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata*, *Mucor racemosus* et *Botrytis cinerea*.

Dans les fromages du commerce, nous avons enfin mis en évidence *Aspergillus fumigatus*, moisissure potentiellement pathogène pour l'homme, et 2 espèces de *Penicillium*.

DISCUSSION

A l'exception de l'année 1976, tous les lots de noix, de variété Franquette, proviennent des vergers expérimentaux de l'INVUFLEC (CTIFL) à Saint-Marcellin. Les premières analyses ont été partielles; cette étude préliminaire

■ cependant permis une mise au point des techniques utilisées par la suite et une première approche, bien que superficielle, de la mycoflore de la noix. Seuls, à notre connaissance, WEHNER et RABIE (1970) avaient abordé une telle étude.

L'analyse fine des **facteurs climatiques** susceptibles de moduler l'altération fongique devrait sans doute amener à une meilleure compréhension des degrés de pollution enregistrés. Parmi ces facteurs, nous avons retenu la pluviométrie, qui est représentée sur la fig. 1.

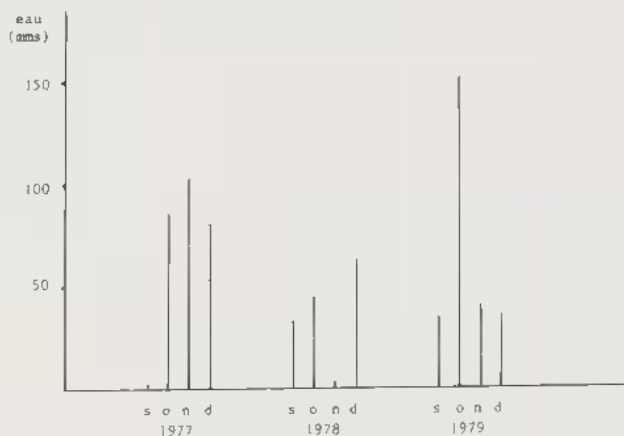


Fig. 1. — Pluviométrie enregistrée au cours des années 1977, 1978 et 1979. s : septembre, o : octobre, n : novembre, d : décembre).

En 1977, on observe de la pluie au début de la récolte et pendant le séchage. Ces conditions, les plus défavorables à la récolte et au séchage naturel, entraînent effectivement une contamination importante. En 1978, on enregistre de la pluie une semaine avant la récolte et de la sécheresse pendant les 15 jours de la récolte et pendant le séchage : cette période sèche ne devrait pas entraîner de différence notable entre le séchage naturel et le séchage artificiel. Les différences cependant observées peuvent alors provenir du mode de lavage. En 1979, les pluies sont abondantes pendant la récolte et pendant le séchage : mais les noix rapidement récoltées sur bêche et séchées artificiellement sont peu contaminées.

Tableau VI. — Flore totale de la noix. Les quatre premières colonnes indiquent la présence des espèces dans les différents lots. Dans la 5^{ème} colonne est exprimée la fréquence des contaminations (a : très fréquentes, 80 à 100%; b : fréquentes, 50 à 80%; c : occasionnelles; d : rares). Les contaminations ont été déterminées selon les techniques de développement direct sur les cerneaux en atmosphère humide et sur milieu au malt. La colonne 1976 correspond à des résultats partiels.

SOUCHES	ANNEES				f.
	1976	1977	1978	1979	
MUCORALES					
<i>Abidia glauca</i> Hagem			+		■
<i>Accinomyces elegans</i> (Pidas) C.R. Benjamin et Messeligne			+		d
<i>Cunninghamella binierei</i> Naumov			+		d
<i>Cunninghamella siegari</i> Lendner	+	+	+		c
<i>Mucor heterosporus</i> Fischer sensu Baijal et Mahrotra		+			d
<i>Mucor hirsutus</i> Wehmer		+	+		c
<i>Mucor muscoides</i> L. ex Fr.			+		d
<i>Mucor plumbeus</i> Bon.			+		d
<i>Mucor racemosus</i> Fres.	+	+	+		e
<i>Mucor racemosus</i> Fres. f. <i>sphaerosporus</i> (Hagem) Schipper	+		+	+	c
<i>Mucor varians</i> Pavah		+			d
<i>Phragmoxes nitens</i> Kunze		+			■
<i>Phisopus armitiae</i> Fischer			+		■
<i>Phisopus stolonifer</i> (Ehrenb. ex Fr.) Lind	+	+	+		b
FUNGI IMPERFECTI					
<i>Acrodontium salmonum</i> de Hoog			+		d
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keiseler	+	+	+	+	a
<i>Alternaria tenuissima</i> (Kuntze ex Pers.) Wilshire			+		d
<i>Arthrinium sphaerosparium</i> Fuckel			+		d
<i>Microbasidium pullians</i> (de Bary) Achnaud	+	+	+	+	a
<i>Botryodiplodia</i> sp.			+		d
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fr.	+	+	+	+	a
<i>Chaetomella</i> sp.			+		■
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	+	+	+	+	a
<i>Cladosporium elatum</i> (Marz) Nannf.			+		d
<i>Epilococcus purpurascens</i> Ehrenb. ex Schlecht.	+	+	+		a
<i>Fusarium arthrosporioides</i> Sherbakoff		+			d
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Sacc.			+		d
<i>Fusarium laterisium</i> Nees ex Fr.					d
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon		+			c
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.	+	+			e
<i>Fusarium roseum</i> (Peck) Wollenw.			+		d
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	+	+			e
<i>Gliocladium roseum</i> Bain.			+		d
<i>Phaeotoma piscae</i> (Munch) H. et P. Sydow		+			d
<i>Phragmoxes variabilis</i> Bain.	+				c
<i>Uromyces herbarum</i> Westend.		+			■
<i>Tichodermma hananinum</i> Rifai	+	+			d
<i>Tichodermma kongii</i> Oudem	+				d
<i>Tichodermma pseudokongii</i> Rifai	+				d
<i>Uromyces</i> sp.			+		■
<i>Uromyces Botrytis</i> Preuss	+				d
<i>Uromyces Lenerum</i> (Nees ex Pers.) Link		+			■

SOUCHES	ANNEES				f.
	1976	1977	1978	1979	
PENICILLIUM					
<i>P. aurantiovinens</i> Biourge		+			d
<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	+		+		b
<i>P. commune</i> Thom		+			d
<i>P. concentricum</i> Samson et al.			+		d
<i>P. cycloptium</i> Westling	+	+			b
<i>P. digitatum</i> Sacc.		+	+		■
<i>P. echinulatum</i> Passatiava		+			d
<i>P. expansum</i> Link ex S.F. Gray	+	+	+	+	a
<i>P. frequentans</i> Westling	+	+	+		■
<i>P. granulatum</i> Bain.		+		+	c
<i>P. italicum</i> Wehmer		+	+		b
<i>P. lanosum</i> Westling			+		d
<i>P. nigricans</i> Bain. ex Thom		+			d
<i>P. pulvillum</i> Turfitt		+	+		■
<i>P. purpureocens</i> (Sopp) Raper et Thom		+			■
<i>P. purpurogenum</i> Stoll		+		+	c
<i>P. roqueforti</i> Thom		+			c
<i>P. rugulosum</i> Thom			+		c
<i>P. thomii</i> Maire		+	+	+	b
<i>P. variabile</i> Sopp		+			d
<i>P. verrucosum</i> var. <i>corymbiferum</i> (Westling) Samson et al.			+		d
<i>P. verrucosum</i> Dierckx var. <i>verrucosum</i>		+			■
<i>P. vitaceum</i> Gilman et Abbott	+	+			d
ASPERGILLUS					
<i>A. astrolodami</i> Church		+			d
<i>A. candidum</i> Link ex Fr.		+			d
<i>A. chevalieri</i> Thom et Raper	+				d
<i>A. echinulatus</i> (Delacr.) Thom et Church		+			■
<i>A. flavus</i> Link ex Fr.	+	+	+	+	c
<i>A. fumigatus</i> Fres.	+				■
<i>A. niger</i> van Tieghem	+	+	+		■
<i>A. ochraceus</i> Wilhelm		+			d
<i>A. parasiticus</i> Speare	+	+	+		c
<i>A. repens</i> (Corda) Sacc.	+	+			c
<i>A. ruber</i> (Koenig et al.) Thom et Church		+			d
<i>A. terreus</i> Thom			+		d
<i>A. ustus</i> (Bain.) Thom et Church		+			■
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	+	+	+	+	b

Bien qu'un certain nombre de paramètres aient été mis en jeu, on peut toutefois constater une certaine stabilité des composants de la mycoflore dans le temps et dans l'espace. La lecture du tableau VI, où sont recensées toutes les espèces fongiques identifiées au cours de quatre années d'observation, fait ressortir les éléments d'une flore «fidèle» (PELHATE, 1968) comprenant: *Penicillium expansum*, *Penicillium frequentans*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum purpurascens*, *Rhizopus stolonifer*, et des espèces permanentes mais faiblement représentées, qui se recrutent dans les genres: *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor* et *Aspergillus*.

Répartition écologique des contaminants

Envisageant le rôle des champignons dans la détérioration des grains et semences au cours du stockage, CHRISTENSEN et KAUFMANN (1965) mettent en évidence un cortège floristique caractéristique des grains stockés qui, compte-tenu de l'origine des contaminants et de leur devenir, se décompose en une «flore du champ» à tendance phytopathogène, et une «flore de stockage» typiquement saprophyte. PELHATE (1968, 1974) introduit une troisième catégorie dite «flore intermédiaire», évoluant sur des hôtes en conditions sub-optimales de conservation.

Si nous tentons d'appliquer cette analyse à la mycoflore recensée sur les cerneaux de noix, nous sommes conduits aux constatations suivantes :

Les espèces caractéristiques de la flore du champ sont en nombre limité. A cette catégorie appartiennent des organismes relativement exigeants en eau, qui végètent activement sur la plante au moment de la récolte, à la limite du parasitisme et du saprophytisme, pour être ensuite véhiculés par les graines; dans des conditions normales, cette mycoflore ne persiste pas après la récolte, les espèces plus compétitives de la flore de stockage, à sporulation intense, intervenant alors.

Chez les céréales, pour lesquelles nous disposons de nombreux relevés floristiques, la flore du champ est essentiellement représentée par des espèces des genres *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*... Parmi ces espèces, quatre sont présentes de façon constante sur les cerneaux de noix: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Epicoccum purpurascens* et *Fusarium solani*; d'autres le sont à fréquence réduite: *Alternaria tenuissima*, *Fusarium spp.* (*culmorum*, *poae*, etc...). Il faut souligner toutefois que ces contaminants ne sont pas spécifiques de la noix. Nous avons noté (rév. 1979) que les noix vertes récoltées sur l'arbre sont pratiquement stériles. Mais les noyers sont plantés parmi des terrains cultivés et des vergers; on conçoit que la flore inféodée à ces commensaux (maïs, arbres fruitiers) puisse s'installer sur les noix au moment du gaulage.

Parmi les espèces de la flore intermédiaire, certaines peuvent avoir une origine précoce et provenir du champ, d'autres apparaître après la récolte; moins spécifiquement phytopathogènes, elles peuvent se développer sur le fruit après la récolte alors que les espèces du champ restent latentes. Cette flore est représentée de façon caractéristique par *Cladosporium cladosporioides*, omniprésent, très

commun dans le sol et dans l'air. Sa régression annonce les espèces de stockage plus compétitives et mieux adaptées. On trouve aussi des Mucorales très résistantes mais qui disparaissent au stockage lorsque la teneur en eau du substrat devient trop faible. En font également partie les genres *Trichothecium*, *Verticillium* (isolé seulement du sol), *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Geotrichum*, *Papulaspora* et *Trichoderma*.

La flore de stockage représentée par les *Penicillium* et les *Aspergillus* constitue l'essentiel de la flore de la noix quels que soient les lots et les années considérées (entre 60 et 80% de la flore totale). Latentes à la récolte, ces espèces plus xérophiles que les précédentes, sont favorisées par la sécheresse du cerneau et se développent au cours du stockage. Les *Penicillium* isolés sont abondants et ubiquistes dans le sol, certains liés aux céréales et aux arbres fruitiers. L'espèce la plus fréquemment rencontrée est le *Penicillium expansum*, bien connu comme agent de pourriture de la pomme; c'est peut-être à cette espèce qu'il faudrait rapporter le *Penicillium juglandis* Weid. décrit par WEIDEMANN (1907) sur la noix. La capacité toxigène de ces souches (production éventuelle de patuline) serait à envisager. Parmi les *Aspergillus*, ceux appartenant au groupe *glaucus*, espèces xérophiles capables d'attaquer des substrats à des taux d'humidité très faibles sont les mieux représentés. *Aspergillus flavus* est le plus rarement mis en évidence. Tous les représentants de la flore de stockage sont d'autant plus dignes d'intérêt qu'ils possèdent souvent un riche équipement enzymatique plus particulièrement protéolytique, lipolytique, cellulolytique et amylolytique (étude en cours) qui fait de la noix un substrat idéal et qui va tendre à dégrader les réserves biochimiques de la graine.

Constatons enfin que la flore du sol superficiel se retrouve pratiquement dans tous les lots de cerneaux.

Étapes de ■ contamination de la noix

Au moment de la pollinisation, des spores de moisissures aérophiles peuvent germer sur le stigmate du pistil et parvenir jusqu'au sac embryonnaire par l'intermédiaire du tube pollinique (HANSSEN et JUNG, 1973). Le fruit jeune, encore vert, peut donc ne pas être stérile. En fait, les analyses effectuées sur des fruits immatures n'ont pas permis de révéler une contamination; on peut donc estimer négligeable, voire nulle, la pollution au moment de la pollinisation. Dans les lots qui nous ont été fournis, les fruits sont parfaitement sains et la flore du champ pratiquement inexistante. L'analyse de fruits mûrs à brous fissurés prélevés sur l'arbre a montré qu'aucun d'entre eux n'était contaminé.

Le ramassage traditionnel des noix au sol après un temps de contact variable avec celui-ci est susceptible d'entraîner un taux de pollution non négligeable par intervention de la flore de l'air, du sol et éventuellement un début d'altération de la coque. De plus, le taux d'humidité présenté à ce moment par la noix est propice au développement de moisissures voire même à l'élaboration de mycotoxines qui persisteront après la récolte lorsque la flore du champ disparaîtra dans les conditions normales de stockage. La récolte sur bêche

réalisée en 1979 avec ramassage immédiat après la chute montre effectivement que les différents lots sont peu contaminés par rapport aux années précédentes.

Les différents modes de lavage utilisés semblent apporter des résultats contradictoires selon les années considérées : on préfère le lavage à l'eau javellisée en 1977, mais en 1978 le lavage semble favoriser la pollution; on peut dès lors penser à une abondance de spores à parois épaisses non altérées par l'eau de javel. En réalité, le lavage a tout d'abord été conduit dans des bains d'eau stagnante, véritables bouillons de culture contribuant à disperser les spores à la surface des coques ou à l'intérieur des fruits si les coques étaient dessoudées. Par la suite, les noix ont été lavées en eau claire et sur tapis roulant ce qui a permis de minimiser ce risque de contamination.

Le mode de séchage est également susceptible d'influencer le taux de pollution : les moisissures ont tendance à se développer dans la mesure où le taux d'humidité du substrat est propice (40 à 50%). Selon les conditions climatiques au moment de la récolte, la noix perd 25 à 38% de son humidité au cours du séchage et la noix sèche ne révèle plus qu'une hydratation de 12%, incompatible avec le développement de moisissures. Le séchage artificiel qui dure 3 à 5 jours paraît préférable au séchage naturel qui s'étale sur 3 semaines à 1 mois : en fait, les conditions de séchage ■ grenier sont trop variables au cours d'une opération et d'une année à l'autre et on peut difficilement prévoir ou en tout cas généraliser l'influence de ce mode de traitement sur la pollution fongique. Le séchage artificiel réduit sans aucun doute considérablement la période pendant laquelle la noix présente un taux d'humidité favorable au développement de moisissures (taux d'humidité > 15%).

Le stockage est habituellement fait en grenier à un stade où la noix présente une teneur en eau inférieure à 12% qui s'oppose à toute nouvelle sporulation et surinfection. Il ne peut y avoir qu'inter-contamination par contact des noix entre elles. Si l'on considère les modes de conservation réalisés à différentes températures et par rapport aux résultats obtenus à température ambiante, on peut dire que des phénomènes de condensation favorisent la multiplication des contaminants. Dans la limite des températures choisies (- 18° C à + 10° C), la viabilité des Micromycètes est maintenue dans toutes les conditions, même sous azote à - 18° C. Le mode de conditionnement devient alors prépondérant et son choix important pour la commercialisation et l'utilisation ultérieure.

En conclusion, la période de sensibilité de la noix est bien précise et se situe entre la chute du fruit et son séchage, le taux d'humidité étant alors supérieur à 15%. Dans les conditions expérimentales de l'année 1979, elle s'étale sur 6 ou 7 jours.

Localisation de la contamination

Malgré l'importante proportion de noix contaminées, rares sont les cerneaux altérés. Les moisissures tapissent l'intérieur de la coquille, la surface des cloisons mais ■ ■ développent pas sur les cerneaux. Le tégument brun jaune (tegmen et

testa) qui recouvre les cerneaux, renferme des tanins galliques et constitue un obstacle imperméable vis-à-vis des microorganismes. D'après KOLATTU-KUDY (1980), on y trouverait la cutine, biopolyester, qui forme une barrière biologique de protection du végétal vis-à-vis de l'environnement et qui contrôle la diffusion des molécules. Seuls quelques champignons microscopiques phytopathogènes possédant des cutinases sont susceptibles de ■ développer avec de la cutine comme seule source de carbone. L'absence de cet équipement enzymatique chez les contaminants fongiques de la noix justifierait leur localisation sur les coques et les cloisons.

Cerneaux et industrie fromagère

L'utilisation des noix en fromagerie exige un état sanitaire optimal des cerneaux. En fait, la présence de moisissures en nombre plus ou moins important a été constatée à tous les stades d'observation, de la récolte des noix à leur introduction dans les fromages. Dans ces conditions, il est très difficile de conditionner des fromages dépourvus de contaminants fongiques.

Un risque majeur de ces contaminations est l'existence de mycotoxines, dont nous avons envisagé la production dans les cerneaux.

La recherche d'aflatoxines dans plusieurs lots de noix s'est révélée négative; les souches d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus parasiticus* qui en ont été isolées ne sont pas toxinogènes. Il ne faut cependant pas négliger l'existence possible de mycotoxines d'autant que JEMMALI et MAZERAND (1980) mettent en évidence de la zéaralénone dans les noix du commerce. La recherche systématique de ces métabolites mériterait dès à présent d'être faite dans les cerneaux destinés à l'alimentation humaine. Bien que l'on sache que la P.R. toxine n'est pas synthétisée par *Penicillium roqueforti* lors de la fabrication du roquefort, l'étude de souches susceptibles d'être toxinogènes dans certaines conditions mériterait de retenir l'attention; leur présence devrait être révélée et leur évolution dans le temps devrait être suivie lors de la commercialisation de fromages à base de noix.

CONCLUSION

La présence d'une mycoflore très diversifiée sur des cerneaux de noix ramassées et traitées de façon traditionnelle pose un problème, difficile à résoudre, au niveau de leur utilisation dans l'industrie fromagère. Comme MULTON et coll. (1973) ont pu le définir, l'état sanitaire de graines est une résultante complexe et relative dans la mesure où l'on envisage leur utilisation ultérieure. Il s'agit d'une notion évolutive et ces auteurs distinguent l'état sanitaire instantané et l'état sanitaire prospectif qui nous intéresse plus particulièrement puisque nous envisageons la noix en vue d'une utilisation bien définie.

Toutefois, cette étude nous a permis de préciser un certain nombre de points :

- la contamination fongique, rarement amorcée avant la récolte, est produite au moment du ramassage : les analyses ont montré le bien fondé d'une récolte sur bêche qui diminue largement les contaminations dues au contact plus ou moins prolongé avec le sol.

- les traitements ultérieurs (lavage, séchage) doivent contribuer à minimiser le développement de la mycoflore : on préconise le lavage à l'eau claire sur tapis roulant et le séchage artificiel.

- le problème du stockage reste un peu plus complexe, les essais effectués tendant à prouver que la meilleure conservation doit être réalisée sous azote.

- le fromage devrait être conditionné dans une atmosphère la plus stérile possible dans la mesure où un traitement éventuel des cerneaux permettrait de les obtenir dépourvus de toute contamination fongique.

- enfin, une recherche systématique des mycotoxines devrait être développée dans ces produits destinés à l'alimentation humaine.

BIBLIOGRAPHIE

- CAHAGNIER B. et POISSON J., 1973 — La microflore des grains de maïs humide : composition et évolution en fonction de divers modes de stockage. *Rev. de Mycol.* 38: 23-43.
- CARANTINO S., POISSON J. et CAHAGNIER B., 1976 — La microflore des graines de féverole : son évolution au cours d'essais de stockage en fonction des conditions hydriques réalisées. *Rev. de Mycol.* 40: 223-243.
- CHARPENTIER M.J. et MARAKIS St., 1980 — La mycoflore des caroubes (*Ceratonia siliqua* L.). *Cryptog. Mycol.* 1: 165-174.
- CHARPENTIER M.J. et NICOT J., 1978 — La mycoflore des graines de pois : recensement et remarques d'ordre biologique. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 94: 289-298.
- CHARPENTIER M.J., POISSON J. et CAHAGNIER B., 1976 — Évolution de la microflore du pois en fonction des conditions de stockage. *Rev. de Mycol.* 40: 401-415.
- CHRISTENSEN C.M. et KAUFMANN H.H., 1965 — Deterioration of stored grains by fungi. *Annual Rev. of Phytopathology* 3: 69-84.
- FRAZIER W.C., 1967 — Food Microbiology. New York, St Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney : Mc Graw-Hill Book Company.
- HANSEN E. et JUNG M., 1973 — Control of aflatoxins in the food industry. *Pure and Appl. Chem.* 35: 239-250.
- JEMMALI M. et MAZERAND C., 1980 — Présence de zéaralénone ou F₂ dans les noix du commerce. *Ann. Microbiol.* 131: 319-321.
- KODAL D., 1965 — Viability of *Escherichia coli* on English walnut meats (*Juglans regia*). *J. Fd. Sci.* 30: 325-332.
- KOLATTUKUDY P.E., 1980 — Biopolyester membranes of plants : cutin and suberin. *Science* 208: 990-1000.

- MOREAU C., 1976 — Variation de la pollution fongique des arachides et de leurs tourteaux de la récolte à la consommation. *Rev. de Mycol.* 40: 97-115.
- MULTON J.L., TRENTESAUX E. et GUILBOT A., 1973 — Détermination de l'aptitude des grains à l'utilisation immédiate et au stockage. *Ann. Technol. Agric.* 22: 335-350.
- PARKINSON D., WALD J.S., edit., 1960 — The ecology of soil fungi. Liverpool University Press.
- PELHATE J., 1968 — Inventaire de la mycoflore des blés de conservation. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 84: 127-143.
- PELHATE J., 1974 — Maladies des grains stockés (blé, orge). Rapport général. C.R. 4ème J. Phytiatric Phytopharm. Montpellier : 236-256.
- PELHATE J., 1979 — Mycoflore séminicole des maïs. I. Contamination avant récolte. *Rev. de Mycol.* 43: 109-125.
- WALIYAR F. et ROQUEBERT M.F., 1979 — Mycoflore des gousses et des graines d'arachide au Sénégal. *Rev. de Mycol.* 43: 169-186.
- WEHNER F.C. et RABIE C.J., 1970 — The micro-organisms in nuts and dried fruits. *Phytophylactica* 2: 165-170.
- WEIDEMANN C., 1907 — Morphologische und physiologische Beschreibung einiger *Penicillium*-arten. *Zentbl. Bakt. Parasitkde* 19: 675-690.

Ce travail a été réalisé grâce à une aide financière dans le cadre d'un contrat avec l'Établissement Public Régional et d'une action DGRST-CTIFL.